

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

New
Toshihiro Mori
f. 3-25-04
Birch, Stewart, et al.
(703) 265-8006
1 of 2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日

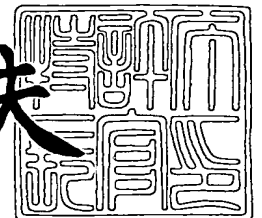
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 9 0 3 8 5
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 0 3 8 5]

出 願 人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

2 0 0 4 年 3 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 2 0 2 2 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 A31117A

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11
B01D 15/00
C01B 25/42

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 森 寿弘

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 牧野 快彦

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205141

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の分離精製装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 開口部が形成される先端部と、第 2 開口部が形成される基端部とを有し、前記第 1 開口部と第 2 開口部との間の収納部内に液体を保持可能な円筒形のシリンジと、

前記先端部に接続され、先端側に流通孔が形成された固相保持部材とを備えており、

前記固相保持部材の内部には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な固相が収納されており、

さらに、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーが接続されていることを特徴とする、核酸の分離精製装置。

【請求項 2】 前記第 2 開口部側から前記収納部内へ延びるプランジャと、該プランジャの先端に設けられ、前記収納部の内面に密接可能で且つ前記収納部内でスライド可能な液密部材とを備えているピストン部材を備えていることを特徴とする、請求項 1 に記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 3】 前記ピストン部材にはさらに、前記ピストン部材を先端部側へ移行させたときには閉状態となるが、前記ピストン部材を基端部側へ移行させたときには開状態となる逆止弁が設けられていることを特徴とする、請求項 2 に記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 4】 前記第 2 開口部に、収納部内を加圧状態にすることができるポンプが接続されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 5】 前記固相保持部材の先端側内面には前記シリンジの長手方向軸線にはほぼ垂直な円形の固相支持面が形成されており、円形に形成された前記固相が前記固相支持面と平行に配置され、円形に形成された前記シリンジの先端部の先端が前記固相の円形外周縁のすぐ内側に当接して、固相を前記固相支持面側へ押圧していることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 6】 表面に水酸基を有する有機高分子がアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項 1～5 のいずれかに記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 7】 表面に水酸基を有する有機高分子がトリアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項 1～6 のいずれかに記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 8】 アセチルセルロースの表面鹸化率が 5 % 以上である、請求項 6 または 7 に記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 9】 アセチルセルロースの表面鹸化率が 10 % 以上である、請求項 6 または 7 に記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 10】 アセチルセルロースが多孔膜又は非孔性膜である、請求項 6～9 のいずれかに記載の核酸の分離精製装置。

【請求項 11】 少なくとも 2 個以上の複数個の請求項 1 から 10 の何れかに記載の核酸の分離精製装置を連結することによって構成され、各々の核酸の分離精製装置にそれぞれ別個の圧力センサーが接続されており、各々の核酸の分離精製装置の収納部内の圧力を個別に検出することができる、核酸の分離精製装置。

【請求項 12】 請求項 1 から 11 の何れかに記載の核酸の分離精製装置を使用し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着させることを含む、核酸の分離精製方法。

【請求項 13】 収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーを用いて、収納部内の圧力をモニターし、圧力の変化により、収納部内の液が排出されたことを感知する、請求項 12 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 14】 試料溶液が、細胞又はウイルスを含む検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である、請求項 12 または 13 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 15】 核酸可溶化試薬が、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素である、請求項 12 から 14 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 16】 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着させた後、核酸洗浄バッファを用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着した核

酸を脱着せしめうる液を用いて固相に吸着した核酸を脱着させる工程を含む、請求項 12 から 15 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 17】 核酸洗浄バッファが、メタノール、エタノール、イソプロパノール又は *n*-プロパノールを 20～100 重量%含む溶液である、請求項 16 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 18】 固相に吸着した核酸を脱着せしめうる液が、塩濃度が 0.5 M 以下の溶液である、請求項 16 または 17 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 19】 下記の工程により核酸の分離精製を行う、請求項 12 から 18 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

(a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、第 2 開口部から上記の核酸を含む試料溶液を収納部内に注入する工程、

(b) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製装置の上記第 2 開口部から核酸洗浄バッファを注入する工程、

(d) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製装置の上記第 2 開口部から表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記流通孔より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、核酸分離精製装置外に排出する工程。

【請求項 20】 工程 (b)、(d) 及び (f) において、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーを用いて、収納部内の圧力をモニターし、圧力の変化により、収納部内の液が排出されたことを感知し、液の排出の感知後に、次の工程に進む、請求項 19 に記載の核酸の分離精製方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、核酸の分離精製装置、及び該装置を使用する核酸の分離精製方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0003】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0004】

広く知られた精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の表面に吸着させ、引き続く洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法は、分離性能としては優れているが、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい、さらに遠心分離を使用する方法では自動化が難しい等の問題点がある。

【0 0 0 5】

また、核酸を精製するための周知の方法として、ピストンもしくはポンプによってシリンジの内部を加圧することによって上記固相に核酸を吸着及び脱着させる方法がある。従来の方法では、シリンジ内部を加圧した後、一定時間経過して、シリンジ内部の液体をシリンジ外部に排出した後に、次の操作を行っていた。しかし、液体の性状（特に、液体の粘度など）によってシリンジ内部の液体の全てをシリンジ外部に押し出す時間変動するという問題がある。即ち、粘度の高い液体を使用する場合には、シリンジ内部の液体の全量を押し出すのに比較的長時間を要するのに対し、粘度の低い液体の場合には、より短時間でシリンジ内部の液体の全量を押し出すことができる。そのため、多種類の検体から核酸を自動化装置を用いて同時に精製する場合、全種類の液体についてシリンジ内部の検体の全量を確実に排出するためには、最も高い粘度の検体の場合でも全量を押し出せるのに十分時間を設定する必要がある、操作に時間がかかるという問題があった。さらに、たとえ十分な時間を設定しても、検体の全量が確実に排出したことを確認する手段はなかった。また、装置の自動化のためには、シリンジ内部の検体の全量が排出したことをモニタリングすることが必要であった。

【0 0 0 6】**【特許文献 1】**

特公平 7 - 5 1 0 6 5 号公報

【0 0 0 7】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法を実現し、且つ分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である固相を使用し、かつ操作の時間を短縮した自動化しやすい核酸分離精製装置を提供することである。本発明のさらに別の目的は、上記した核酸分離精製装置を使用した核酸分離精製方法を提供することである。

【0 0 0 8】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、核酸を固相に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、前記固相として表面に水酸基を有する有機高分子を使用し、二個の開口を有する容器内に上記固相を収容し、さらに圧力センサーを設けた核酸分離精製装置を使用することによって、核酸を含む試料溶液から迅速に核酸を分離することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成した核酸の分離精製方法を実現するための分離精製装置である。

【0009】

即ち、本発明によれば、第1開口部が形成される先端部と、第2開口部が形成される基端部とを有し、前記第1開口部と第2開口部との間の収納部内に液体を保持可能な円筒形のシリンジと、

前記先端部に接続され、先端側に流通孔が形成された固相保持部材とを備えており、

前記固相保持部材の内部には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な固相が収納されており、

さらに、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーが接続されていることを特徴とする、核酸の分離精製装置が提供される。

【0010】

本発明の第一の態様によれば、前記第2開口部側から前記収納部内へ延びるプランジャと、該プランジャの先端に設けられ、前記収納部の内面に密接可能で且つ前記収納部内でスライド可能な液密部材とを備えているピストン部材を備えていることを特徴とする、上記の核酸の分離精製装置が提供される。

好ましくは、前記ピストン部材にはさらに、前記ピストン部材を先端部側へ移行させたときには閉状態となるが、前記ピストン部材を基端部側へ移行させたときには開状態となる逆止弁が設けられている。

【0011】

本発明の第二の態様によれば、前記第2開口部に、収納部内を加圧状態にすることができるポンプが接続されていることを特徴とする、上記の核酸の分離精製装置が提供される。

【0012】

好ましくは、前記固相保持部材の先端側内面には前記シリンジの長手方向軸線にはほぼ垂直な円形の固相支持面が形成されており、円形に形成された前記固相が前記固相支持面と平行に配置され、円形に形成された前記シリンジの先端部の先端が前記固相の円形外周縁のすぐ内側に当接して、固相を前記固相支持面側へ押圧している。

【0013】

好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子がアセチルセルロースの表面鹸化物であり、さらに好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子がトリアセチルセルロースの表面鹸化物である。

好ましくは、アセチルセルロースの表面鹸化率が5%以上であり、さらに好ましくは10%以上である。

アセチルセルロースは多孔膜でもよいし、非孔性膜でもよい。

好ましくは、少なくとも2個以上の複数個の上記した核酸の分離精製装置を連結することによって構成され、各々の核酸の分離精製装置にそれぞれ別個の圧力センサーが接続されており、各々の核酸の分離精製装置の収納部内の圧力を個別に検出することができる、核酸の分離精製装置が提供される。

【0014】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の核酸の分離精製装置を使用し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着させることを含む、核酸の分離精製方法が提供される。

好ましくは、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーを用いて、収納部内の圧力をモニターし、圧力の変化により、収納部内の液が排出されたことを感知する。

好ましくは、試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。

好ましくは、核酸可溶化試薬は、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素である。

【0015】

好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着させた後、核酸洗浄バッファを用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着した核酸を脱着せしめうる液を用いて固相に吸着した核酸を脱着させることにより核酸の分離精製を行うことができる。

好ましくは、核酸洗浄バッファは、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-プロパノールを20～100重量%含む溶液である。

好ましくは、固相に吸着した核酸を脱着せしめうる液は、塩濃度が0.5M以下の溶液である。

【0016】

本発明では、下記の工程により核酸の分離精製を行うことができる。

(a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、第2開口部から上記の核酸を含む試料溶液を収納部内に注入する工程、

(b) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製装置の上記第2開口部から核酸洗浄バッファを注入する工程、

(d) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製装置の上記第2開口部から表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記流通孔より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、核酸分離精製装置外に排出する工程。

【0017】

好ましくは、上記工程(b)、(d)及び(f)において、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーを用いて、収納部内の圧力をモニターし、圧

力の変化により、収納部内の液が排出されたことを感知し、液の排出の感知後に、次の工程に進むことができる。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の核酸の分離精製装置の構成要素について具体的に説明する。

(1) 核酸の分離精製装置

本発明の核酸の分離精製装置は、第1開口部が形成される先端部と、第2開口部が形成される基端部とを有し、前記第1開口部と第2開口部との間の収納部内に液体を保持可能な円筒形のシリンジと、

前記先端部に接続され、先端側に流通孔が形成された固相保持部材とを備えており、

前記固相保持部材の内部には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な固相が収納されており、

さらに収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーが接続されていることを特徴とする。

【0019】

本発明の第一の態様によれば、前記第2開口部側から前記収納部内へ延びるプランジャと、該プランジャの先端に設けられ、前記収納部の内面に密接可能で且つ前記収納部内でスライド可能な液密部材とを備えているピストン部材を備えており、前記ピストン部材に、収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーが接続されている。

【0020】

本発明の核酸の分離精製装置の第一の態様の一例を以下に図面を参照して説明する。

本発明の核酸の分離精製装置1は、図1に示すように円筒形のシリンジ3と、シリンジ3の内部に挿入されるピストン部材5と、シリンジ3の先端部に接続される固相保持部材7とを備えて成る。尚、本発明においては、シリンジ3内の液体が押し出される側を「先端」側とし、その反対方向を「基端」側とする。

シリンジ3は、固相保持部材7が接続される先端部9を有し、該先端部9には

第1開口部11が形成されている。またシリンジ3の基端側にはフランジ部13が形成される基端部15を有し、基端部15には第2開口部17が形成されるとともに、核酸の分離精製装置1を適宜の固定装置に固定するための固定機構18がフランジ部13に対して設けられている。シリンジ3の内部には収納部19が形成されており、該収納部19には、第1開口部11または第2開口部17から入った液体を後述するOリングの液密作用により保持可能である。

【0021】

図2に示すように、シリンジ3の先端部9には、固相保持部材7が外嵌め可能であるように外周面が先端方向へ縮径するテーパ21が形成されている。尚、このようなテーパ21の代わりに、図3に示すようにシリンジ3の先端部9の外周面に雄ねじ23を形成し、固相保持部材7の基端側内面に雄ねじ23に対応する雌ねじ25を形成して、固相保持部材7がシリンジ3の先端部9に対して螺合式に着脱自在な構成とすることも可能である。

【0022】

またシリンジ3の先端部9の内側には、図5に最も良く示されているように、任意の縦断面が先端側から基端側へ向かって2次曲線的にカーブするような形状を有し、全体としてほぼすり鉢形状を有する液体案内面27が形成されている。このような形状の液体案内面27の作用については後述する。またシリンジ3の先端部9の任意の縦断面では、先端部9の先端29が鋭角的に尖っており、後述する表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相の表面に圧接することで固相を保持する作用を発揮する。この点については後で詳述する。

【0023】

ピストン部材5は、第2開口部17側から収納部19内へ延びるプランジャ31と、プランジャ31の先端の周囲に設けられ、収納部19の内面に密接可能で液密部材として機能するOリング33と、プランジャ31を操作しやすくするための操作部34とを備えている。Oリング33はプランジャ31の先端に固定されており、従ってプランジャ31を押したり引いたりすることにより、Oリング33が収納部19内で往復動できるようになっている。

【0024】

次に固相保持部材 7 は図 4 に示すように、ほぼ円筒形乃至若干の先細り形状をした本体部 35 を主体とし、その基端側が開放状態となっており、先端側は端板 37 によって塞がっている。端板 37 の中央からは先端側にノズル 39 が突出形成されており、ノズル 39 の内部には本体部 35 内へ通じる流通孔 41 が形成されている。端板 37 の基端側の内面には、シリンジ 3 の長手方向軸線にほぼ垂直な円形の固相支持面 43 が形成されており、該固相支持面 43 には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る円形平板状の固相 45 が支持されている。この固相 45 は後で詳述するように試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な材質で構成されている。

【0025】

また固相 45 の先端側には、クッション作用をなすポリプロピレン焼結フィルター 46 が設けられている。ポリプロピレン焼結フィルター 46 は、固相 45 同様、円形平板状の形態をしており、固相 45 と固相支持面 43 との間に設けられることにより、固相 45 がシリンジ 3 の先端部 9 によって押圧されるときに、固相 45 をその基端側から支持してクッション作用を提供する。これにより、固相 45 が過度に押し潰されて変形したり、固相 45 内に形成されている液体が流通する間隙が潰れて液体の流通性が悪くなることを防止することができる。

【0026】

固相保持部材 7 の本体部 35 の内側は、上記シリンジ 3 の先端部 9 に形成されたテーパ 21 に対応して先端方向へ縮径するようにテーパ 47 が形成されている。この固相保持部材 7 のテーパ 47 がシリンジ 3 の先端部 9 に形成されたテーパ 21 の外側に丁度嵌合することにより、シリンジ 3 と固相保持部材 7 との間を液密状態として一体化することができる。

【0027】

固相保持部材 7 がシリンジ 3 の先端部 9 に取り付けられているとき、前述したようにシリンジ先端部 9 の断面が鋭角的に形成された先端 29 が、固相 45 の円形外周縁のすぐ内側に圧接する。これによりポリプロピレン焼結フィルター 46 が多少押し潰された状態となるため、クッション作用を有するポリプロピレン焼結フィルター 46 の反作用により、固相 45 はシリンジ 3 の先端部 9 とポリプロ

ピレン焼結フィルター 46 との間に挟持されるようになる。この結果、固相 45 はポリプロピレン焼結フィルター 46 を介して固相支持面 43 にしっかり支持されるようになる。上述したようにシリンジ先端部 9 の断面が鋭角的に形成された先端 29 が、固相 45 の円形外周縁のすぐ内側に圧接する構成を採用することにより、プランジャ 31 が往復動するときに、収納部 19 内から外側へ押し出される液体または流通孔 41 を介して収納部 19 内へ流入する液体が、必ず固相支持面 43 内を通過するようになり、固相 45 の円形外周縁の外側を回って液体が流通することを防止できる。

【0028】

図 6 は、2 次曲線的にカーブするような形状を有する液体案内面 27 が形成されているシリンジ 3 の先端部 9 内において、収納部 19 内から外側へ押し出される液体が流れ出す様子を示す説明図である。図 6 に示すように、先端部 9 内の最も縮径された縮径部 49 から 2 次曲線的にカーブするような形状を有する液体案内面 27 は、シリンジ 3 の長手軸線の先端側へ移行するに従って、単位長さ当たりの液体案内面 27 の断面の直径の拡張する率、即ち拡張率が小さくなっている。従って縮径部 49 近くでは急に拡張していくが、先端側へいくに従って拡張の度合いが徐々に緩やかになっていく。このような構成により、収納部 19 内から外側へ流れ出す液体の断面での流速分布は、縮径部 49 から固相 45 に至るまでの間ではほぼ一定となり、従って固相 45 の全面に亘ってほぼ一定の流体圧が掛かるようになる。この結果、後述するシリンジ 3 の収納部 19 と外部との間での液体の流通時には、その核酸分離機能や洗浄機能等が固相 45 の全面に亘って有効に発揮されるため、効率的な核酸の分離精製を行うことができる。

【0029】

以上説明した核酸の分離精製装置では、固相保持部材 7 がシリンジ 3 と別部材となっており、固相保持部材 7 がシリンジ 3 から脱着自在となっているが、固相保持部材 7 をシリンジ 3 に対して脱着不可能な状態で固定してもよいし、あるいは固相保持部材 7 とシリンジ 3 とを一体部材として最初から形成するようにしてもよい。

【0030】

次に本発明の特徴的構成について説明する。

本発明の核酸の分離精製装置 1 には、図 1 中符号 59 で示される圧力センサー 59 が設けられている。圧力センサー 59 は、シリンジ内部の圧力の変化を検出するものであり、これによりシリンジ内部の液体（検体）が全て押し出されたかどうかを判別することができる。また、圧力センサーには通常、ピストンの移動を制御する手段が連結されている。圧力センサー 59 がシリンジ内部の圧力の変化を検出した場合、圧力センサー 59 の検出結果に基づいてピストンの移動を制御する制御手段により、ピストンの移動は即座に停止し、続いて当該制御手段はピストンの次の移動操作をピストンに指令し、ピストンはそれに基づいて次の移動操作を行うことができるようになっている。

【0031】

圧力センサーを設けていない従来の核酸の分離精製装置を用いて核酸を精製する場合、どの時点で液体の全量が排出されたかが検出できなかったため、粘度の高い液体を用いた場合でも液体の全量を排出するのに十分な時間を押し出し時間（ピストンを引き下げる時間）として設定し、操作を行っていたが、圧力センサー 59 を設けたことにより、検体の種類に応じてシリンジ内部の液体（検体）が全て押し出された時点を迅速に検出し、その時点で液体の押し出し操作（ピストンの引き下げ操作）を停止し、次の操作を行うことができるようになる。これにより核酸の分離精製に要する時間を短縮することが可能になる。

【0032】

本発明の核酸の分離精製装置 1 には、好ましくは、図 1 中符号 51 で示される逆止弁 51 が設けられている。逆止弁 51 は、プランジャ 31 の先端からプランジャ 31 内を貫通してプランジャ 31 の基端側まで延びる連通路 53 の基端側に設けられており、弁座 55 と、弁座 55 に対して液密状態で接触可能な弁体 57 とを備えている。弁体 57 はプランジャ 31 の長手方向に移動自在であり、従ってピストン部材 5 を先端部 9 側へ移行させるときには、弁体 57 が矢印 A の方向に移行して弁座 55 に着座することで逆止弁 51 は閉状態となるが、ピストン部材 5 を基端部 15 側へ移行させるときには、弁体 57 は矢印 B の方向へ移行して弁座 55 から離れるので、逆止弁 51 は開状態となる。

【0033】

従って図1に示す核酸の分離精製装置1はピストン部材5の押圧時には、収納部19内の液体を外側へ押し出すことができるが、ピストン部材5の引っ張り時には上記逆止弁51の作用により流通孔41から液体を吸引することはできない。その代わり、ピストン部材5の引っ張り時に、流通孔41及び固相45を通して強制的に空気を吸引することがないため、ピストン部材5を容易に基端部15方向に引くことができるようになる。このことにより後述する核酸の分離精製工程で、複数回のピストン部材5の引っ張り動作が容易になるという効果を生じる。また後述する核酸の分離精製工程において、ピストン部材5の引っ張り時に、流通孔41から空気を吸入することがないので、収納部19側に引圧が作用しない。そのため、シリンジ3の内壁およびピストン部材に、核酸を含む試料溶液および核酸洗浄バッファの残留液が飛散し汚染することを防止することができる。

【0034】

図7は逆止弁51の具体的構造の例を示す。図7(a)に示す例では弁座55に対してボール状の弁体57が臨んでおり、ピストン部材5の押圧時には、ボール状の弁体57が弁座55を閉鎖するが、ピストン部材5の引っ張り時にはボール状の弁体57が弁座55から離れて逆止弁51が開放するようになっている。また図7(b)に示す例はいわゆるグラフトホールタイプの逆止弁51を適用したものであり、弁座55に対して揺動可能な弁体57が設けられている。本例でも、ピストン部材5の押圧時には、弁体57が図7(b)中、実線で示す位置に位置決めされることにより弁座55を閉鎖するが、ピストン部材5の引っ張り時には弁体57が図7(b)中、破線で示す位置に揺動して弁座55から離れることにより逆止弁51が開放するようになっている。

【0035】

本発明の第二の態様の核酸の分離精製装置においては、ピストン部材は設けられておらず、ピストン部材の代わりに、前記第2開口部にはポンプが接続されている。このポンプを用いることによって、収納部内を加圧状態にして収納部内の液の排出を行うことができる。

【0036】

また、本発明の核酸の分離精製装置は、2個以上の装置（例えば、2～96個の装置）（例えば、1列×8個＝8個、あるいは12列×8個＝96個などの構成を採ることができる）を連結して用いることができ、この場合、核酸の分離精製装置の各々に圧力センサーを設けることにより、各装置ごとに液の排出をモニターすることができる。即ち、本発明によれば、少なくとも2個以上の複数個の核酸の分離精製装置を連結することによって構成され、各々の核酸の分離精製装置にそれぞれ別個の圧力センサーが接続されており、各々の核酸の分離精製装置の収納部内の圧力を個別に検出することができる、核酸の分離精製装置が提供される。

【0037】

(2) 核酸の分離精製方法

本発明の核酸の分離精製方法は、上記核酸分離装置を使用して、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程である。

「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

表面に水酸基を有する有機高分子としては、アセチルセルロースの表面鹸化物が好ましい。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースの何れでもよいが、特にトリアセチルセルロースが好ましい。本発明では、表面鹸化したアセチルセルロースを固相として使用することが好ましい。ここで表面鹸化とは、鹸化处理液（例えば、NaOH）が接触する表面だけが鹸化されることを言う。本発明では、固相の構造体はアセチルセルロースのままで、固相の表面だけが鹸化されていることが好ましい。これにより、表面鹸化处理の程度（表面鹸化度）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。

【0038】

表面に水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするためには、表面に水酸基を有する有機高分子を膜化することが好ましい。また、アセチルセルロースは多孔膜でも非孔性膜でもよいが、膜を多孔性とすることが更に好ましい。固相が多孔性膜の場合、膜の構造体はアセチルセルロースのままで、構造体の表面だけ

を鹸化することが好ましい。これにより、表面鹸化处理の程度（表面鹸化度）×孔径により空間的な水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。また、膜の構造体はアセチルセルロースから構成されているため、堅固な固相を得ることができる。ここで、アセチルセルロースを表面鹸化して表面にのみ水酸基を導入するということは、構造体はアセチルセルロースのままで、表面をセルロース化するということを意味する。なお、セルロースを原材料として用いると、液体にできないため、工業的に多孔膜や平膜を製造することはできない。

【0039】

例えば、トリアセチルセルロースの膜は、商品名TACベースとして富士写真フイルムから市販されており、トリアセチルセルロースの多孔膜としては、ミクロフィルターFM500（富士写真フイルム（株）製）がある。

また、例えばポリエチレン製のビーズの表面にトリアセチルセルロースの膜を形成し、これを表面鹸化して表面に水酸基を持たせることも好ましい。この場合、トリアセチルセルロースはビーズにコーティングされることになる。ビーズの素材は、核酸を汚染等しなければよく、ポリエチレンには限定されない。

【0040】

核酸の分離効率を挙げるためには、水酸基の数が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、表面鹸化率が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。

アセチルセルロースを表面鹸化するには、水酸化ナトリウム水溶液中に、表面鹸化したい対象を浸漬する。表面鹸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えればよい。表面鹸化率は、NMRにより、残存アセチル基を定量して定められる。

【0041】

本発明の核酸の分離精製方法は、以下の工程を含むことができる。

(a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、第2開口部から上記の核酸を含む試料溶液を収納部内に注入する工程、

(b) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分

子から成る固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製装置の上記第2開口部から核酸洗浄バッファを注入する工程、

(d) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記流通孔より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製装置の上記第2開口部から表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製装置の前記収納部内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記流通孔より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、核酸分離精製装置外に排出する工程。

【0042】

表面に水酸基を有する有機高分子を用いた核酸の分離精製方法についてさらに具体的に説明する。本発明では、好ましくは、核酸を含む試料溶液を表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させることにより試料溶液中の核酸を固相に吸着させ、次いで、固相に吸着させた核酸を、以下に説明する好適な溶液を用いて固相から脱着させる。さらに好ましくは、核酸を含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を細胞膜及び核膜を溶解する溶液で処理することにより核酸を液中に分散させた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。

【0043】

本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0044】

最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散

する。

【0045】

細胞膜の溶解および核酸の可溶化のためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、①赤血球の除去、②各種タンパク質の除去、及び③白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。①赤血球の除去および②各種タンパク質の除去は、固相への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、③白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、③白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程で核酸を可溶化することが必要である。本明細書中以下に記載の実施例では、塩酸グアニジン、T r i t o n-X 100、プロテアーゼK（S I G M A製）を添加した状態で60℃で10分インキュベートすることによって上記の①、②及び③を同時に達成している。

【0046】

本発明で用いる核酸可溶化試薬としては、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。

グアニジン塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のグアニジン塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。グアニジン塩の溶液中の濃度は、0.5 M以上6 M以下 好ましくは 1 M以上5 M以下である。

【0047】

界面活性剤としてはT r i t o n-X 100を使用することができるが、この他にも、S D S、コール酸ナトリウム又はサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、T w e e n 20又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル（T r i t o n-X 100）等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

【0048】

タンパク質分解酵素としては、プロテアーゼKを使用することはできるが、他

のプロテアーゼでも同様の効果を得ることができる。プロテアーゼは酵素であるため加温するのが好ましく、37℃～70℃で使用するものが好ましく、特に50℃～65℃で使用するものが好ましい。

【0049】

このように核酸が分散した水溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、表面に水酸基を有する有機高分子と接触させる。この操作により、試料溶液中の核酸が表面に水酸基を有する有機高分子に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化された核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着させるためには、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することが必要である。

【0050】

即ち、核酸の周りに存在する水分子の水和構造を破壊することにより、核酸は不安定な状態で可溶化することになる。この状態の核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相と接触させると、核酸表面上の極性基と固相表面の極性基間で相互作用し、核酸は固相表面上に吸着するものと考えられる。本発明の方法では、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することによって、核酸を不安定な状態にさせることができる。

【0051】

ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

【0052】

得られた核酸混合液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解および

核酸の可溶化の効果を併有するので特に好ましい。

【0053】

次いで、この核酸が吸着した表面に水酸基を有する有機高分子を核酸洗浄バッファ溶液に接触させる。この溶液は核酸と一緒に表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、表面に水酸基を有する有機高分子から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなる。主剤としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノール、アセトン等の約10～100重量%（好ましくは約20～100重量%、さらに好ましくは約40～80重量%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エタノール、Tris及びTriton-X100を含む溶液が好ましい。Tris及びTriton-X100の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～10重量%である。

【0054】

次に、表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液に、上記洗浄後の表面に水酸基を有する有機高分子を接触させる。この溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。核酸を脱着せしめうる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

【0055】

(3) 核酸分離精製装置の使用による核酸の分離精製方法

本発明の一例として、図1から図6に記載した核酸分離精製装置を使用した、核酸の精製方法について説明する。まず、ピストン部材5を第2開口部17から取り去った状態で、第2開口部17からピペット等を使用して核酸を含む試料溶液を収納部19内に注入する。次いで第2開口部17にピストン部材5を挿入して収納部19内を加圧状態にし、注入した試料溶液を、流通孔41より排出する

。この排出過程で、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相 45 に、試料溶液中にある核酸が吸着する。

【0056】

次に再度、ピストン部材 5 を第 2 開口部 17 から取り去り、第 2 開口部 17 から核酸洗浄バッファを注入する。そして第 2 開口部 17 にピストン部材 5 を再度挿入して収納部 19 内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを流通孔 41 より排出することにより収納部 19 内部を洗浄する。

【0057】

この核酸洗浄バッファは収納部内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。従って、固相 45 から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなり、主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約 10～90%（好ましくは約 50～90%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、Tris 及び Triton-X100 を含む溶液が好ましい。Tris 及び Triton-X100 の好ましい濃度は、それぞれ 10～100mM、及び 0.1～10% である。

【0058】

次に再度、ピストン部材 5 を第 2 開口部 17 から取り去り、第 2 開口部 17 から固相 45 に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する。そして第 2 開口部 17 にピストン部材 5 を挿入して収納部 19 内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を流通孔 41 より排出させる。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えば PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供することができる。

【0059】

（４）本発明の装置を利用した核酸の分析方法

本発明によれば、（１）上記した核酸分離精製方法によりターゲット核酸断片を含む核酸断片を分離精製する工程；

(2) 前記ターゲット核酸断片、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼを反応させ、前記ターゲット核酸断片を鋳型にした前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応を行う工程；及び、

(3) ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出する工程；

により、核酸を分析することができる。

【0060】

本発明の好ましい態様によれば、ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロリン酸を検出することによりポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出することができる。

さらに好ましい態様は、ピロリン酸の分析を比色法を用いて行う方法であり、より好ましくは、ピロリン酸の検出を乾式分析素子を用いて行う方法である。本発明による核酸の分析方法では、ターゲット核酸断片の存在または存在量を検出したり、あるいはターゲット核酸断片の塩基配列を検出することができる。なお、ここで言う存在量の検出とは、ターゲット核酸断片の定量を含む概念である。ターゲット核酸断片の塩基配列の検出の具体例としては、ターゲット核酸断片の変異または多型の検出などが挙げられる。

【0061】

本発明に係るターゲット核酸断片の分析方法の第一の好ましい形態を以下に列記する。

(イ) ピロリン酸の検出を、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備えることを特徴とするピロリン酸定量用乾式分析素子を用いて行う。

(ロ) ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択されるポリメラーゼを用いる。

【0062】

さらに、本発明の別の態様では、ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無の検出を前記ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロリン酸を検出することにより行う際に、ピロリン酸の検出を、ピロリン酸を酵素的に無機リンに変換した後、次いでキサンチンまたはイノシン、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備える無機リン定量用乾式分析素子を用いて行うことができる。この場合の好ましい形態を以下に列記する。

(イ) ピロリン酸を変換する酵素として、ピロホスファターゼを用いる。

(ロ) ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクロー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択されるポリメラーゼを用いる。

【0063】

以下、本発明の核酸の分析方法について更に詳細に説明する。

(A) ターゲット核酸断片：本発明において分析の対象となるターゲット核酸断片とは、少なくとも一部の塩基配列が既知であるポリヌクレオチドであり、動物、微生物、細菌、植物などすべての生物から単離されるゲノミックDNA断片が対象となり得る。またウイルスから単離可能なRNA断片またはDNA断片、およびmRNAを鋳型として合成されたcDNA断片も対象とすることが可能である。ターゲット核酸断片はできる限り精製され、核酸断片以外の余分な成分が取り除かれていることが望ましい。例えば、動物（例えば人間）の血液から単離したゲノミックDNA断片を対象とする場合または血液中に存在する感染細菌やウイルスの核酸（DNAまたはRNA）断片を対象とする場合、単離の過程で破壊された白血球細胞膜、赤血球中から溶出したヘモグロビン、および血液中存在するその他の一般化学物質は、十分に除去しておく必要がある。特にヘモグロビンは、続いておこなうポリメラーゼ伸長反応を阻害する。また血液中に一般生化学物質として存在するピロリン酸やリン酸は、ポリメラーゼ伸長反応により生成するピロリン酸の正確な検出の妨害要因になる。

【0064】

(B) ターゲット核酸断片と相補的なプライマー：本発明において使用するターゲット核酸断片と相補的なプライマーは、ターゲット核酸断片の塩基配列が既知である目的の部位に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。このターゲット核酸断片と相補的なプライマーがターゲット核酸断片の目的の部位にハイブリダイゼーションすることで、プライマーの3'末端を起点に、ターゲット核酸を鋳型としポリメラーゼ伸長反応が進行する。即ち、本発明においてはプライマーがターゲット核酸断片の目的の部位を認識して特異的にハイブリダイゼーションするか否かがポイントとなる。本発明で使用するプライマーの好ましい塩基数は5～60塩基である。特に好ましくは15～40塩基である。プライマーの塩基数は少なすぎると、ターゲット核酸断片の目的の部位との特異性が低下するだけでなく、ターゲット核酸断片とのハイブリッド自体が安定に形成できない。また、プライマーの塩基数が多すぎると、プライマー間またはプライマー内で塩基間の水素結合により2本鎖を形成してしまい、やはり特異性が低下する。

【0065】

本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の存在を検出する場合、ターゲット核酸断片の異なる部位に対して、それぞれの部位に相補的なプライマーを複数使用することも可能である。このようにターゲット核酸断片を複数の部位で認識することで、ターゲット核酸断片の存在の検出において、特異性が向上する。また、ターゲット核酸断片の一部を増幅（例えばPCR法）する場合には、その増幅法に応じて複数のプライマーを設計することも可能である。

【0066】

本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の塩基配列を検出する場合、特に変異または多型の有無を検出する場合は、目的の変異または多型の部分を含むように、変異または多型に対応する塩基の種類でプライマーを設計する。そうすることで、ターゲット核酸断片の変異または多型の有無により、ターゲット核酸断片へのプライマーのハイブリダイゼーションの有無に差異が生じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することが可能になる。また、変異または多型に対応する部分をプライマーの3'末端付近に設定することでポリメラーゼの反

応部位の認識に差異が生じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することも可能である。

【0067】

(C) ポリメラーゼ：本発明において使用するポリメラーゼは、ターゲット核酸がDNAの場合は、ターゲット核酸断片の一本鎖に変性された部分にプライマーがハイブリダイゼーションすることで形成された2本鎖の部分を起点として、5' → 3' の方向に、デオキシヌクレオシド3リン酸 (dNTP) を材料として、ターゲット核酸断片を鋳型にして相補的な伸長反応を触媒するDNAポリメラーゼである。具体的に使用されるDNAポリメラーゼとしては、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ等がある。DNAポリメラーゼは目的に応じて選択または組み合わせることが可能である。例えば、ターゲット核酸断片の一部を増幅（例えばPCR法）する場合には、耐熱性に優れたTaq DNAポリメラーゼを用いることが有効である。また、「BIO INDUSTRY, Vol. 18, No. 2, 2001」に記載されている増幅法（LAMP法：Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA）を用いてターゲット核酸断片の一部を増幅する場合には、5' → 3' 方向へのヌクレアーゼ活性がなく、かつ鋳型上の2本鎖DNAを1本鎖DNAとして遊離させながら伸長反応を触媒する鎖置換型のDNAポリメラーゼとして、Bst DNAポリメラーゼを使用することが有効である。その他、目的に応じて、3' → 5' 方向へのヘキソキナーゼ活性を持つ、DNAポリメラーゼ α 、T4 DNAポリメラーゼ、及びT7 DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0068】

また、RNAウイルスのゲノミック核酸またはmRNAがターゲット核酸断片である場合には、逆転写活性を有するリバーストランスクリプターゼを使用することが可能である。さらにリバーストランスクリプターゼとTaq DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0069】

(D) ポリメラーゼ伸長反応：本発明において対象となるポリメラーゼ伸長反応

には、前記 (A) に記載されているようなターゲット核酸断片の 1 本鎖に変性された部分の一部に特異的にハイブリダイゼーションした、前記 (B) に記載されているようなターゲット核酸断片と相補的なプライマーの 3' 末端を起点として、デオキシヌクレオシド 3 リン酸 (d N T P) を材料として、前記 (C) に記載されているようなポリメラーゼを触媒として、ターゲット核酸断片を鋳型にして進行する相補的な核酸の伸長反応の全てが含まれる。この相補的な核酸の伸長反応とは、少なくとも 2 回 (2 塩基分)、連続しての伸長反応が起こることをさしている。

【0070】

以下に、例として代表的なポリメラーゼ伸長反応、およびポリメラーゼ伸長反応を伴うターゲット核酸断片の目的部位の増幅反応の例を示す。ターゲット核酸断片を鋳型にして、5' → 3' の方向へのポリメラーゼ伸長反応を一度だけ行う場合が最も単純である。このポリメラーゼ伸長反応は等温の条件で実施することができる。この場合には、ポリメラーゼ伸長反応の結果として生成するピロリン酸の量は、最初のターゲット核酸断片の量に比例する。即ち定量的にターゲット核酸断片の存在を検出するのに適した方法である。

【0071】

ターゲット核酸の量が少ない場合は、ポリメラーゼ伸長反応を利用した何らかの手段でターゲット核酸の目的部分を増幅することが好ましい。ターゲット核酸の増幅には、これまで開発、発明されてきた各種の方法を使用することができる。ターゲット核酸の増幅法で最も一般的で普及している方法は P C R (ポリメラーゼチェーンリアクション) 法である。P C R 法では、反応液の温度の上げ下げを周期的にコントロールすることにより、変性 (核酸断片を 2 本鎖から 1 本鎖に変性する工程) → アニール (1 本鎖に変性した核酸断片にプライマーをハイブリダイズさせる工程) → ポリメラーゼ (T a q D N A ポリメラーゼ) 伸長反応 → ディネイチャーの周期的な工程を繰り返すことで、ターゲット核酸断片の目的部分を増幅する方法である。最終的に、ターゲット核酸断片の目的部位は初期量の 100 万倍にも増幅し得る。そのため P C R 法の増幅過程でのポリメラーゼ伸長反応で生成するピロリン酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。

【0072】

特開平5-130870号公報に記載されている、エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法もポリメラーゼ伸長反応を利用した、ターゲット核酸断片の目的部位の増幅法の一つである。この方法はターゲット核酸断片の目的部位に特異的にハイブリダイゼーションしたプライマーを起点とした、ポリメラーゼ伸長反応とともに、5' → 3' エクソヌクレアーゼを作用させて、プライマーを逆方向から分解する方法である。分解したプライマーの代わりに新たなプライマーがハイブリダイゼーションし、再度DNAポリメラーゼによる伸長反応が進行する。このポリメラーゼによる伸長反応と、この先に伸長した鎖を外すエクソヌクレアーゼによる分解反応が順次、周期的に繰り返される。ここで、ポリメラーゼによる伸長反応とエクソヌクレアーゼによる分解反応は等温条件で実施することが可能である。このサイクリングアッセイ法においても繰り返されるポリメラーゼ伸長反応で生成するピロリン酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。

【0073】

近年開発されたターゲット核酸断片の目的部位の増幅法として、前記LAMP法がある。この方法は、ターゲット核酸断片の少なくとも6個所の特定部位を相補的に認識する少なくとも4種のプライマーと、5' → 3' 方向へのヌクレアーゼ活性がなく、かつ鋳型上の2本鎖DNAを1本鎖DNAとして遊離させながら伸長反応を触媒する鎖置換型のBst DNAポリメラーゼを使用することで、等温条件でターゲット核酸断片の目的部位を、特別な構造として増幅する方法である。このLAMP法の増幅効率は高く、ポリメラーゼ伸長反応で生成するピロリン酸の蓄積量も非常に多くなり、検出が容易になる。

【0074】

ターゲット核酸断片がRNA断片の場合は、逆転写活性を有するリバーストランスクリプターゼを使用し、RNA鎖を鋳型にして伸長反応を行うことが可能である。さらにリバーストランスクリプターゼとTaq DNAポリメラーゼを併用し、RT（リバーストランスクリプション）反応に引き続いてPCR反応を行う、RT-PCR法を用いることができる。このRT反応またはRT-PCR反応で生成するピロリン酸を検出することで、ターゲット核酸断片のRNA断片の存

在を検出することができる。この方法は、RNAウイルスの存在を検出する場合に有効である。

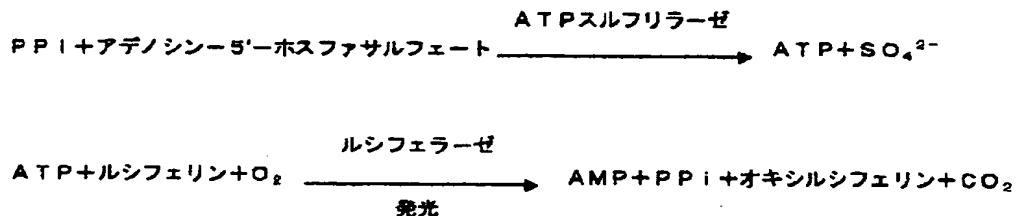
【0075】

(E) ピロリン酸 (PPi) の検出：従来からピロリン酸 (PPi) の検出法としては、式1に示された方法が知られている。この方法では、ピロリン酸 (PPi) をスルフィラーゼによりアデノシン3リン酸 (ATP) に変換し、アデノシン3リン酸がルシフェラーゼによりルシフェリンに作用して生じる発光を検出する。そのため、この方法でピロリン酸 (PPi) を検出するには発光を測定できる装置が必要である。

【0076】

【化1】

(式1)

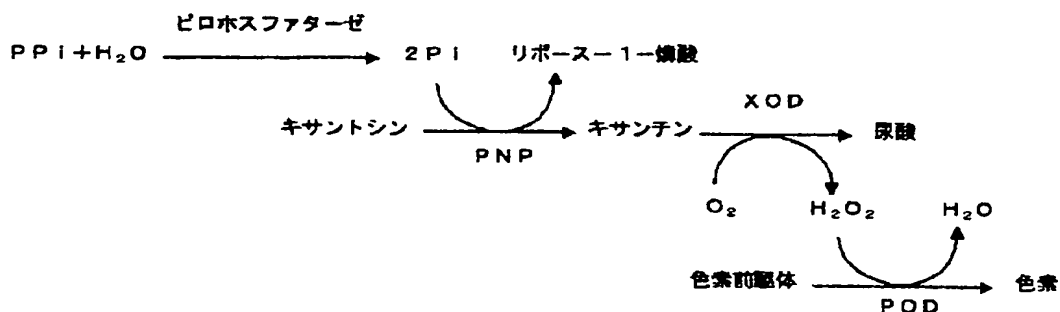


【0077】

本発明に適したピロリン酸の検出方法は式2または式3に示した方法である。式2または式3に示した方法は、ピロリン酸 (PPi) をピロホスファターゼで無機リン (Pi) に変換し、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) により無機リン (Pi) をキサンチンまたはイノシンと反応させ、生じたキサンチンまたはヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼ (XOD) により酸化して尿酸を生成させ、この酸化過程で生じる過酸化水素 (H₂O₂) を用いてペルオキシダーゼ (POD) により発色剤 (色素前駆体) を発色させ、これを比色するものである。これら式2または式3に示した方法では結果を比色で検出できるため、目視または簡単な比色測定装置を用いてピロリン酸 (PPi) の検出が可能である。

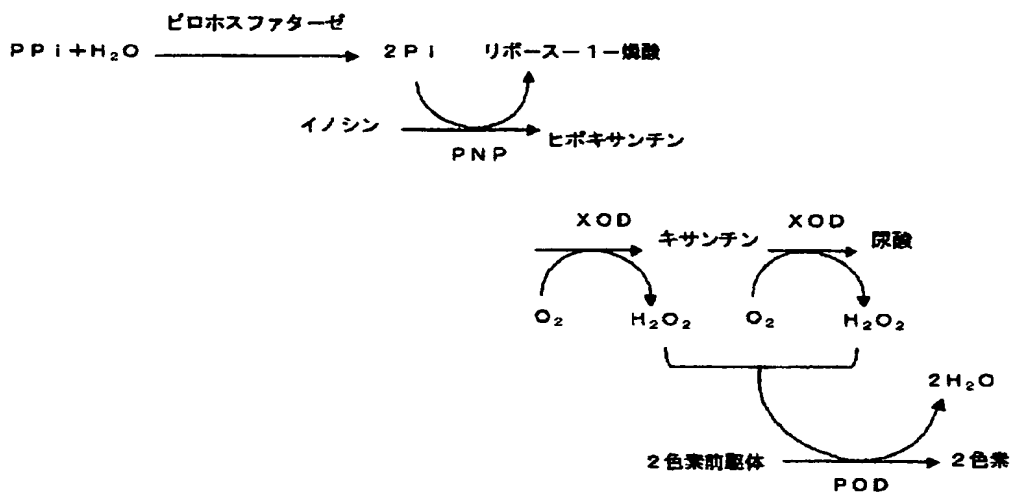
【0078】

【化2】



【0079】

【化3】



【0080】

ピロホスファターゼ (EC 3, 6, 1, 1) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP, EC 2. 4. 2. 1)、キサンチンオキシダーゼ (XOD, EC 1. 2. 3. 2) 及びペルオキシダーゼ (POD, EC 1. 11. 1. 7) は市販のものを使用することができる。発色剤 (すなわち色素前駆体) は、過酸化水素とペルオキシダーゼ (POD) により色素を生成させるものであればよく、例えば、ロイコ色素の酸化によって色素を生成する組成物 (例、米国特許 4, 089, 747 等に記載のトリアリールイミダゾールロイコ色素、特開昭 59-193352 号公報 (EP 0122641A) 等に記載のジアリールイミダゾールロイ

コ色素) ; 酸化されたときに他の化合物とカップリングにより色素を生成する化合物を含む組成物 (例えば 4-アミノアンチピリン類とフェノール類又はナフトール類) などを使用することができる。

【0081】

(F) 乾式分析素子：本発明において使用することのできる乾式分析素子とは、一層または複数層の機能層からなる分析素子であって、その少なくとも一層 (または複数の層に渡って) に検出試薬を含有させ、層内での反応により生じた生成色素を、分析素子の外から反射光あるいは透過光により比色定量するものである。

このような乾式分析素子を用いて定量分析するには、液体試料を展開層の表面に一定量点着する。展開層で展開された液体試料は試薬層に達し、ここで試薬と反応し、発色する。点着後、乾式分析素子を適当な時間、一定温度に保って (インキュベーション) 発色反応を十分に進行させた後、例えば透明支持体側から照明光を試薬層に照射し、特定波長域で反射光量を測定して反射光学濃度を求め、予め求めておいた検量線に基づいて定量分析を行う。

【0082】

乾式分析素子においては、検出を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないいわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

【0083】

(G) ピロリン酸定量用乾式分析素子：本発明で使用することのできるピロリン酸定量用乾式分析素子は、公知の多種の乾式分析素子と同様の層構成とすることができる。乾式分析素子は、前記 (E) 項 (ピロリン酸 (PPi) の検出) における、式 2 または式 3 の反応を行うための試薬の他、支持体、展開層、検出層、光遮蔽層、接着層、吸水層、下塗り層その他の層を含む多重層としてもよい。このような乾式分析素子として、例えば特開昭 49-53888 号公報 (対応米国特許 3,992,158)、特開昭 51-40191 号公報 (対応米国特許 4,042

、335)、及び特開昭55-164356号公報(対応米国特許4,292,272)、特開昭61-4959号公報(対応EPC公開特許0166365A)の各明細書に開示されたものがある。

【0084】

本発明で用いることができる乾式分析素子としては、ピロリン酸を無機リンに変換する試薬、および無機リンの量に応じた発色反応を行う試薬群を含有する試薬層を備えるピロリン酸定量用乾式分析素子が挙げられる。

【0085】

このピロリン酸定量用乾式分析素子においては、ピロホスファターゼを用いて酵素的にピロリン酸(P P i)を無機リン(P i)に変換するまでは本明細書中上記した通り行うことができ、それ以降は、生化学検査分野で既知の以下に述べる「無機リンの定量法」(及びそれらに用いられる各反応の組み合わせ)を用いることにより、無機リン(P i)の量に応じた発色反応を行うことができる。

【0086】

なお、「無機リン」を表記する場合、リン酸(リン酸イオン)として、「P i」と表記する場合と「 HPO_4^{2-} 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ 」と表記する両方の場合がある。以下に示す反応の例では、「P i」として表記するが、同じ反応式に対して「 HPO_4^{2-} 」と表記する場合もある。

【0087】

無機リンの定量法としては酵素法とリンモリブデン酸塩法が知られている。以下、無機リンの定量法としての酵素法とリンモリブデン酸塩法について説明する。

A. 酵素法

P iを定量検出するための一連の反応における最後の「呈色反応」に用いる酵素に応じて、ペルオキシダーゼ(P O D)を用いる方法とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G 6 P D H)を用いる方法がある。以下、これらの方法の具体例を説明する。

【0088】

(1) ペルオキシダーゼ(P O D)を用いる方法の例

(1-1)

無機燐 (P_i) を、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) により、イノシンと反応させ、生じたヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼ (XOD) により酸化して尿酸を生成する。この酸化過程で生じる過酸化水素 (H₂O₂) を用いて、ペルオキシダーゼ (POD) により、4-アミノアンチピリン (4-AA) とフェノールとを酸化縮合させてキノンイミン色素を形成し、これを比色する。

(1-2)

無機燐 (P_i)、コカルボキシラーゼ (TPP)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、Mg²⁺の存在下で、ピルビン酸をピルビン酸オキシダーゼ (POP) により酸化してアセチル酢酸を生成する。この酸化過程で生じる過酸化水素 (H₂O₂) を用いて、上記 (1-1) の場合と同様に、ペルオキシダーゼ (POD) により、4-アミノアンチピリン (4-AA) とフェノールとを酸化縮合させてキノンイミン色素を形成し、これを比色する。

【0089】

なお、上記の (1-1) および (1-2) における最後の呈色反応は、過酸化水素の検出試薬として既知の「Trinder 試薬」を使用して行うことができる。この反応で、フェノールは「水素供与体」として働く。「水素供与体」として用いるフェノールは古典的で、現在は改良された様々な「水素供与体」が使用されている。このような水素供与体の具体例としては、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニリジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニリジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイ

ジン、及びN-スルホプロピルアニリンなどが挙げられる。

【0090】

(2) グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) を用いる方法

(2-1)

無機リン (Pi) とグリコーゲンとをホスホリラーゼを用いて反応させ、グルコース-1-リン酸 (G-1-P) を生成させる。生じたグルコース-1-リン酸をホスホグルコムターゼ (PGM) により、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) にする。グルコース-6-リン酸とニコチアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) との存在下、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) により、NADを還元してNADHにし、これを比色する。

(2-2)

無機リン (Pi) とマルトースとをマルトースホスホリラーゼ (MP) を用いて反応させ、グルコース-1-リン酸 (G-1-P) を反応させる。以下、上記 (2-1) と同様に、生じたグルコース-1-リン酸をホスホグルコムターゼ (PGM) により、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) にする。グルコース-6-リン酸とニコチアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) との存在下、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) により、NADを還元してNADHにし、これを比色する。

【0091】

B. 燐モリブテン酸塩法

酸性下で無機燐 (燐酸塩) と水溶性モリブデン酸イオンとを錯化させた「燐モリブデン酸塩 ($H_3[PO_4Mo_{12}O_{36}]$) を直接定量する「直接法」と、上記直接法の反応に続いて、還元剤により、Mo (IV) からMo (III) として、モリブデン青 (Mo (III)) を定量する「還元法」とがある。水溶性モリブデン酸イオンの例としては、モリブデン酸アルミニウム、モリブデン酸カドミウム、モリブデン酸カルシウム、モリブデン酸バリウム、モリブデン酸リチウム、モリブデン酸カリウム、モリブデン酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウムなどが挙げられる。還元法で使用される代表的な還元剤の例としては、1, 2, 4 アミノナフトールスルホン酸、硫酸第一鉄アンモニウム、塩化第一鉄、塩化第一スズ

ヒドラジン、硫酸-p-メチルアミノフェノール、N,N-ジメチルフェニレンジアミン、アスコルピン酸、マラカイトグリーンなどが挙げられる。

【0092】

光透過性水不透過性支持体を用いる場合の乾式分析素子は、実用的に次のような構成を取り得る。ただし、本発明の内容はこれに限定されない。

- (1) 支持体上に試薬層を有するもの。
- (2) 支持体上に検出層、試薬層をこの順に有するもの。
- (3) 支持体上に検出層、光反射層、試薬層をこの順に有するもの。
- (4) 支持体上に第2試薬層、光反射層、第1試薬層をこの順に有するもの。
- (5) 支持体上に検出層、第2試薬層、光反射層、第1試薬層をこの順に有するもの。

【0093】

上記(1)ないし(3)において試薬層は異なる複数の層から成ってもよい。例えば第1試薬層には、式2または式3に示すピロホスファターゼ反応に必要な酵素ピロホスファターゼ、PNP反応に必要な基質キサントシンまたは基質イノシンと酵素PNPを、第2試薬層には、式2または式3に示すXOD反応に必要な酵素XODを、そして第3試薬層には、式2または式3に示すPOD反応に必要な酵素PODと発色色素(色素前駆体)を、それぞれ含有させてもよい。あるいは試薬層を2層として、第1試薬層ではピロホスファターゼ反応とPNP反応を、第2試薬層ではXOD反応とPOD反応を進行させてもよい。又は、第1試薬層ではピロホスファターゼ反応とPNP反応とXOD反応を、第2試薬層でPOD反応を進行させてもよい。

【0094】

なお支持体と試薬層又は検出層との間には吸水層を設けてもよい。また各層の間には濾過層を設けてもよい。また試薬層の上には展開層を設けてもよく、その間に接着層を設けてもよい。

支持体は光不透過性(不透明)、光半透過性(半透明)、光透過性(透明)のいずれのものも用いることができるが、一般的には光透過性で水不透過性の支持体が好ましい。光透過性水不透過性支持体の材料として好ましいものはポリエチ

レンテレフタレート、ポリスチレンである。親水性層を強固に接着させるため通常、下塗り層を設けるか、親水化処理を施す。

【0095】

試薬層として多孔性層を用いる場合、その多孔性媒体は繊維質であってもよいし、非繊維質であってもよい。繊維質材料としては、例えば濾紙、不織布、織物布地（例えば平織り布地）、編物布地（例えばトリコット編物布地）、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。非繊維質材料としては特開昭49-53888号公報等に記載の酢酸セルロースなどからなるメンブランフィルター、特開昭49-53888号公報、特開昭55-90859号公報（対応米国特許4,258,001）特開昭58-70163号公報（対応米国特許4,486,537）等に記載の無機物又は有機物微粒子からなる連続空隙含有粒状構造物層等のいずれでもよい。特開昭61-4959号公報（対応欧州公開EP 0166365A）、特開昭62-116258号公報、特開昭62-138756号公報（対応欧州公開EP 0226465A）、特開昭62-138757号公報（対応欧州公開EP 0226465A）、特開昭62-138758号公報（対応欧州公開EP 0226465A）等に記載の部分接着された複数の多孔性層の積層物も好適である。

【0096】

多孔性層は、供給される液体の量にはほぼ比例した面積に液体を展開する、いわゆる計量作用を有する展開層であってもよい。展開層としては、これらのうち織物布地、編物布地などが好ましい。織物布地などは特開昭57-66359号公報に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため特開昭60-222770号公報（対応：EP 0162301A）、特開昭63-219397号公報（対応西独特許公開DE 3717913A）、特開昭63-112999号公報（対応：DE 3717913A）、特開昭62-182652号公報（対応：DE 3717913A）に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有させてもよい。

【0097】

例えば紙、布、高分子からなる多孔質膜等に本発明の試薬を予め含浸又は塗布

した後、支持体上に設けた他の水浸透性層、例えば検出層の上に、特開昭55-1645356号公報のような方法で接着させるのも有用な方法である。

こうして作られる試薬層の厚さは特に制限されないが、塗布層として設ける場合には、 $1\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ 程度、好ましくは $2\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ の範囲が適当である。ラミネートによる積層など、塗布以外の方法による場合、厚さは数十 μm から数百 μm の範囲で大きく変化し得る。

【0098】

親水性ポリマーバインダーからなる水浸透性層で試薬層を構成する場合、使用できる親水性ポリマーとしては、例えば、以下のものがある。ゼラチン及びこれらの誘導体（例えばフタル化ゼラチン）、セルロース誘導体（例えばヒドロキシエチルセルロース）、アガロース、アルギン酸ナトリウム、アクリルアミド共重合体やメタアクリルアミド共重合体（例えば、アクリルアミド又はメタアクリルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体）、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリル酸と各種ビニル性モノマーとの共重合体などである。

【0099】

親水性ポリマーバインダーで構成される試薬層は、特公昭53-21677号公報（対応米国特許3,992,158）、特開昭55-164356号公報（対応米国特許4,292,272）、特開昭54-101398号公報（対応米国特許4,132,528）等の明細書に記載の方法に従って本発明の試薬組成物と親水性ポリマーを含む水溶液又は水分散液を支持体又は検出層等の他の層の上に塗布し乾燥することにより設けることができる。親水性ポリマーをバインダーとする試薬層の乾燥時の厚さは約 $2\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $4\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ の範囲、被覆量では約 $2\text{g}/\text{m}^2\sim 50\text{g}/\text{m}^2$ 、好ましくは約 $4\text{g}/\text{m}^2\sim 30\text{g}/\text{m}^2$ の範囲である。

【0100】

試薬層には式2または式3の試薬組成物の他に、塗布特性、拡散性化合物の拡散性、反応性、保存性等の諸性能の向上を目的として、酵素の活性化剤、補酵素、界面活性剤、pH緩衝剤組成物、微粉末、酸化防止剤、その他、有機物あるい

は無機物からなる各種添加剤を加える事ができる。試薬層に含有させることができる緩衝剤はの例としては、日本化学学会編「化学便覧 基礎」(丸善(株)、1966年発行)1312-1320頁、R. M. C. Dawson et al編、「Data for Biochemical Research」第2版(Oxford at the Clarendon Press, 1969年発行)476-508頁、「Biochemistry」5, 467-477頁(1966年)、「Analytical Biochemistry」104, 300-310頁(1980年)に記載のpH緩衝剤系がある。pH緩衝剤系の具体例として硼酸塩を含む緩衝剤;クエン酸又はクエン酸塩を含む緩衝剤;グリシンを含む緩衝剤;ビシン(Bicine)を含む緩衝剤;HEPESを含む緩衝剤;MESを含む緩衝剤などのグッド緩衝剤等がある。なお燐酸塩を含む緩衝剤は、ピロ燐酸検出用乾式分析素子に使用することはできない。

【0101】

本発明で使用する事のできる、ピロ燐酸定量用乾式分析素子は前述の諸特許明細書に記載の公知の方法により調製することができる。ピロ燐酸定量用乾式分析素子は一辺約5mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-283331号公報(対応米国特許4,169,751)、実開昭56-142454号公報(対応米国特許4,387,990)、特開昭57-63452号公報、実開昭58-32350号公報、特表昭58-501144号公報(対応国際公:WO083/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、又は小片を開口のある容器内に収めて用いたり、又は小片を開口カードに貼付または収めて用いたり、あるいは裁断した小片をそのまま用いることなどもできる。

【0102】

本発明で使用する事のできるピロ燐酸定量用乾式分析素子は前述の諸特許明細書等に記載の操作と同様の操作により液体試料中の被検物であるピロ燐酸の定量検出ができる。例えば約2 μ L~約30 μ L、好ましくは4 μ L~15 μ Lの

範囲の水性液体試料液を試薬層に点着する。点着した分析素子を約 20℃～約 45℃の範囲の一定温度で、好ましくは約 30℃～約 40℃の範囲内の一定温度で 1～10 分間インキュベーションする。分析素子内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中のピロリン酸の量を求めることができる。点着する液体試料の量、インキュベーション時間及び温度を一定にすることにより定量分析を高精度に実施できる。

【0103】

測定操作は特開昭 60-125543 号公報、特開昭 60-220862 号公報、特開昭 61-294367 号公報、特開昭 58-161867 号公報（対応米国特許 4,424,191）などに記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行ってもよい。

【0104】

本発明で使用することのできる、ピロリン酸定量乾式分析素子においては、分析を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないいわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

【0105】

本発明の第二の形態において使用することのできる無機燐定量用乾式分析素子は、前記のピロリン酸定量乾式分析素子における試薬層からピロホスファターゼを除くことで調製することができる。また、特開平 7-197 号公報に記載の乾式分析素子を使用することも可能である。無機燐定量用乾式分析素子は、試薬層にピロホスファターゼを含有しない以外は、その層構成、製造方法、使用方法において、前記ピロリン酸定量乾式分析素子と同様である。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0106】

【実施例】**(1) 材料及び試薬**

図1～図6に構造を示す核酸精製用カートリッジ（キーエンスの圧力センサー（製品名AP34A圧力センサー）が接続されているもの）を使用し、第2開口部側より試料、洗浄液、蒸留水を順次注入し、そのたびにピストン部材（プランジャ）を挿入し、押した。また、核酸吸着固相としては、富士ミクロフィルターFR250（富士写真フイルム製）を使用した。核酸精製用吸着バッファー溶液及び洗浄バッファー溶液は以下の通り調製した。

【0107】吸着バッファー

塩酸グアニジン（ライフテクノロジー製） 382 g

Tris（ライフテクノロジー製） 12.1 g

Triton-X100（ICN製） 10 g

蒸留水 1000 ml

洗浄バッファー

10 mM Tris-HCl 65%エタノール

【0108】**(2) 核酸精製操作**

所定量のDNAを含む粘度の異なる試料溶液（5種類）を調製し、それぞれの試料溶液200 μ lに、吸着バッファー200 μ lとプロテアーゼK200 μ lを添加して、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え、攪拌した。攪拌後、図1～図6に構造を示す圧力センサー付き核酸精製用カートリッジにこの液を注入した。注入後、ピストンにて液を押し出した。圧力センサーにより、液の全量を押すとその直後に、ピストンによる液の押し出し操作は停止させた。また、比較例として、上記と同じ試料溶液（5種類）を用いて、圧力センサーを設けない核酸精製用カートリッジを用いて上記と同様の操作を行なった。この場合、ピストンの押し出し操作は一定時間（30秒間）行った。

【0109】

続いて、洗浄バッファー 500 μ l を注入し、ピストンにて液を押し出すことにより、カートリッジおよび吸着固相上の不純物を洗浄した。最後に、蒸留水 200 μ l を注入し、ピストンにて液を押し出して、この液を DNA 溶液として回収した。この際にも、圧力センサーにより、液の全量を押し出すとその直後に、ピストンによる液の押し出し操作は停止させた。また、比較例として圧力センサーを設けない核酸精製用カートリッジを用いて上記と同様の操作を行ない、比較例ではピストンの押し出し操作は一定時間（30 秒間）行なった。

【0110】

（3）核酸の回収量の定量

（2）の操作により精製された DNA の収量および操作時間（試料溶液の注入開始から DNA 溶液の回収終了までの時間）を以下の表 1 に示す。表 1 の結果から、本発明により操作時間を短縮できることが分かる。

【0111】

【表 1】

| 試料 No. | DNA (μ g) | 操作時間 |
|--------|----------------|-------|
| 1（本発明） | 6.2 | 110 秒 |
| 2（本発明） | 4.6 | 96 秒 |
| 3（本発明） | 3.7 | 83 秒 |
| 4（本発明） | 2.3 | 62 秒 |
| 5（本発明） | 0 | 55 秒 |
| 1（比較例） | 5.0 | 130 秒 |
| 2（比較例） | 4.5 | 130 秒 |
| 3（比較例） | 3.9 | 130 秒 |
| 4（比較例） | 2.4 | 130 秒 |
| 5（比較例） | 0 | 130 秒 |

【0112】

【発明の効果】

本発明の核酸の分離精製装置を用いることにより、従来よりも短時間に核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を効率良く分離することができる。また、本発

明の核酸の分離精製装置によれば、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を用いて、核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を効率良く分離することができる。

【0113】

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の核酸分離精製装置を示す側断面図並びに逆止弁及び圧力センサー付きのピストン部材の一部拡大図である。

【図2】

本発明の核酸分離精製装置の分解斜視図である。

【図3】

シリンジと固相保持部材の接合方法の他の実施の形態を示す側断面図である。

【図4】

固相保持部材の拡大断面図である。

【図5】

シリンジの先端部の縦断面図である。

【図6】

シリンジの先端部内において、収納部内から外側へ押し出される液体が流れる様子を示す説明図である。

【図7】

ピストン部材における逆止弁の他の実施の形態を示す説明図である。

【符号の説明】

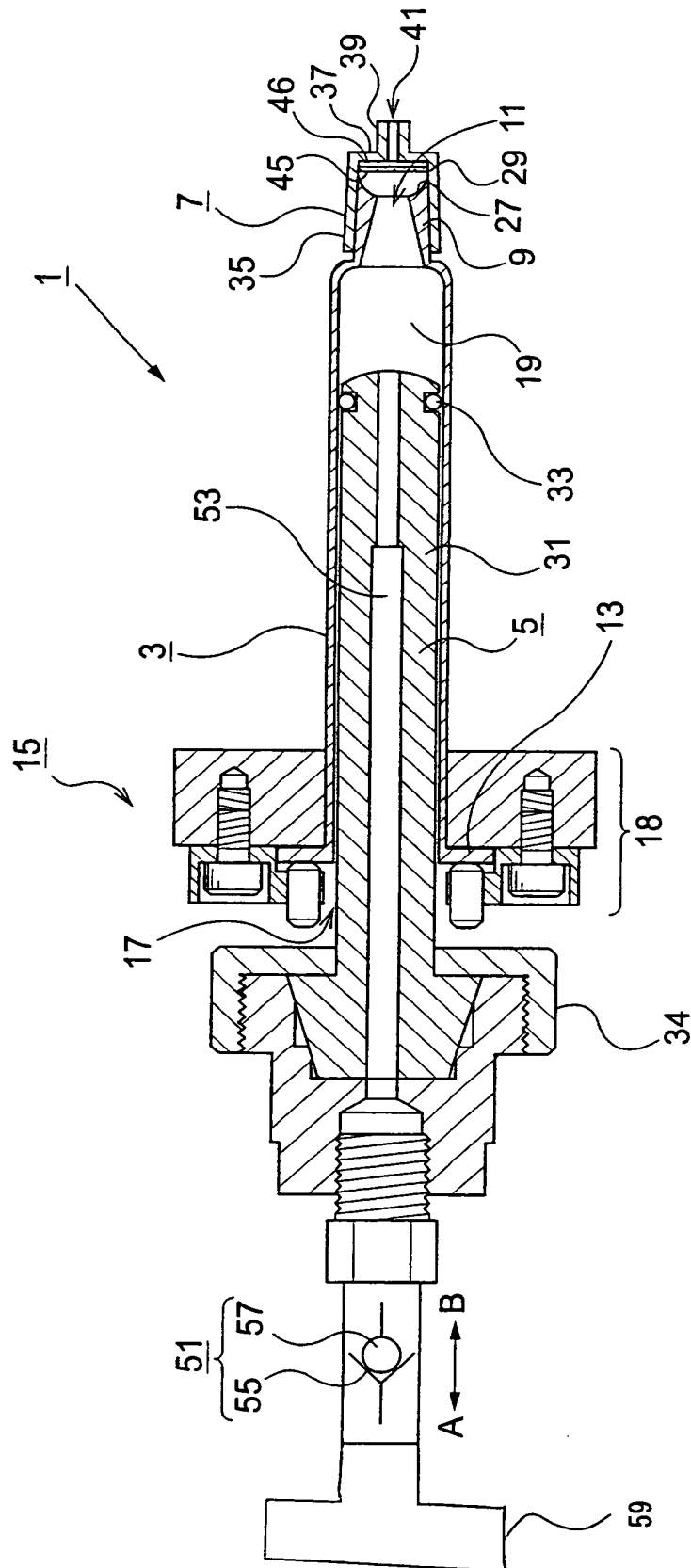
- 1 核酸の分離精製装置
- 3 シリンジ
- 5 ピストン部材
- 7 固相保持部材
- 9 シリンジの先端部
- 11 第1開口部

- 13 フランジ部
- 15 シリンジの基端部
- 17 第2開口部
- 18 固定機構
- 19 収納部
- 21 テーパ
- 23 雄ねじ
- 25 雌ねじ
- 27 液体案内面
- 29 先端部の先端
- 31 プランジャ
- 33 Oーリング
- 34 操作部
- 35 本体部
- 37 端板
- 39 ノズル
- 41 流通孔
- 43 固相支持面
- 45 固相
- 46 ポリプロピレン焼結フィルター
- 47 テーパ
- 49 縮径部
- 51 逆止弁
- 53 連通路
- 55 弁座
- 57 弁体
- 59 圧力センサー

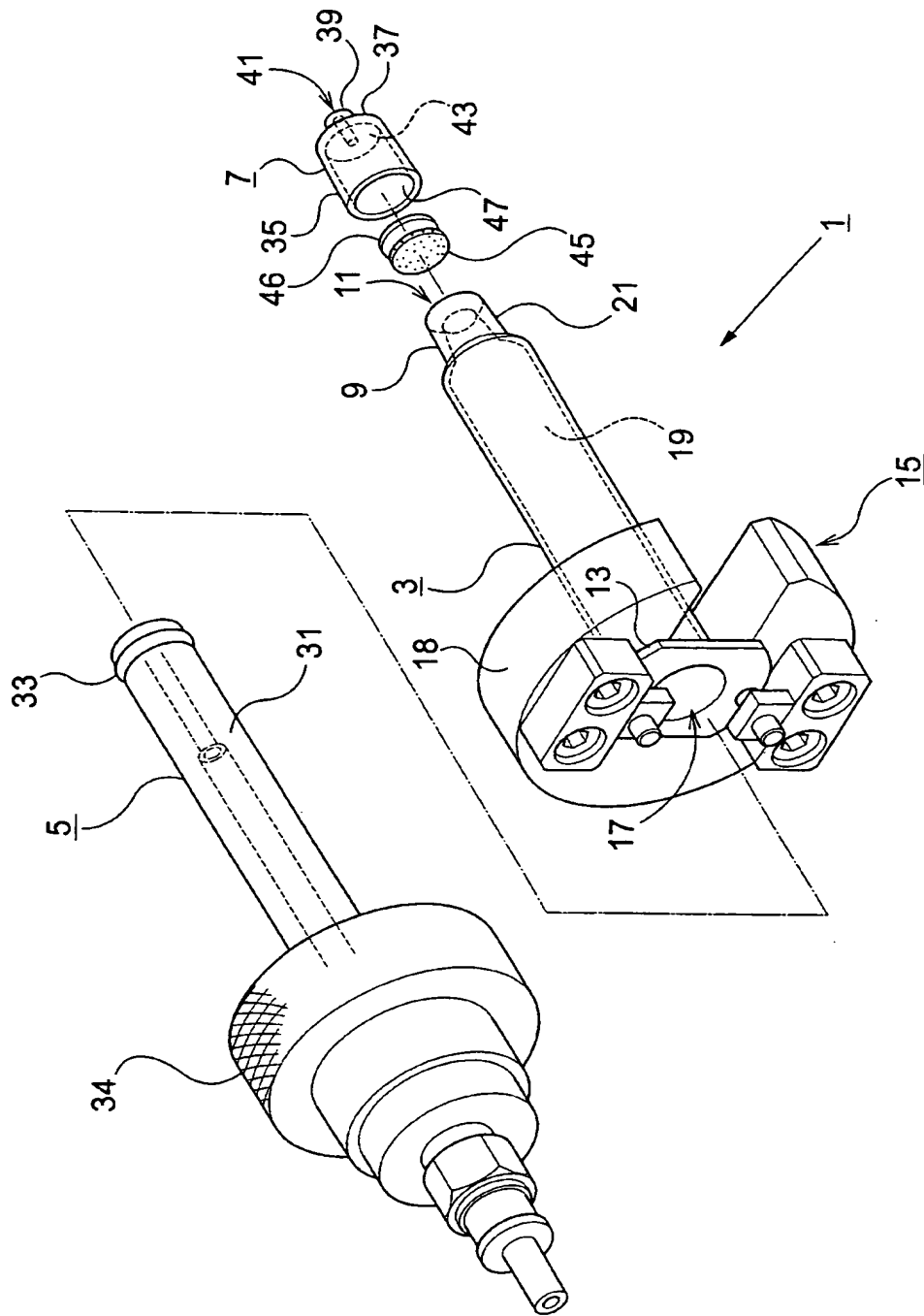
【書類名】

図面

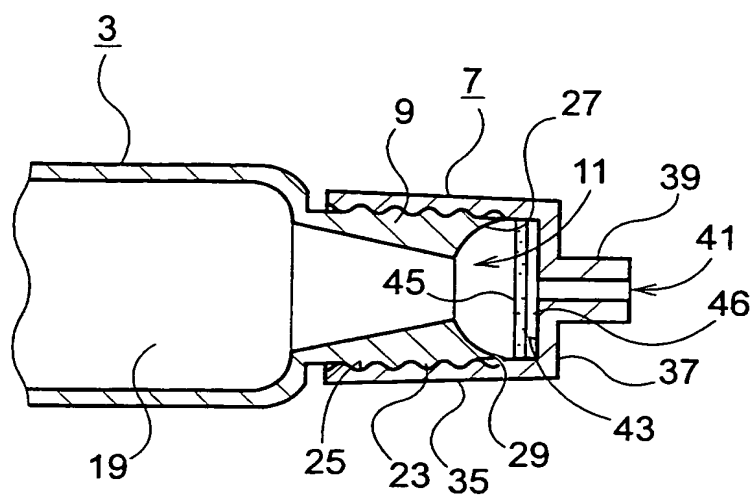
【図 1】



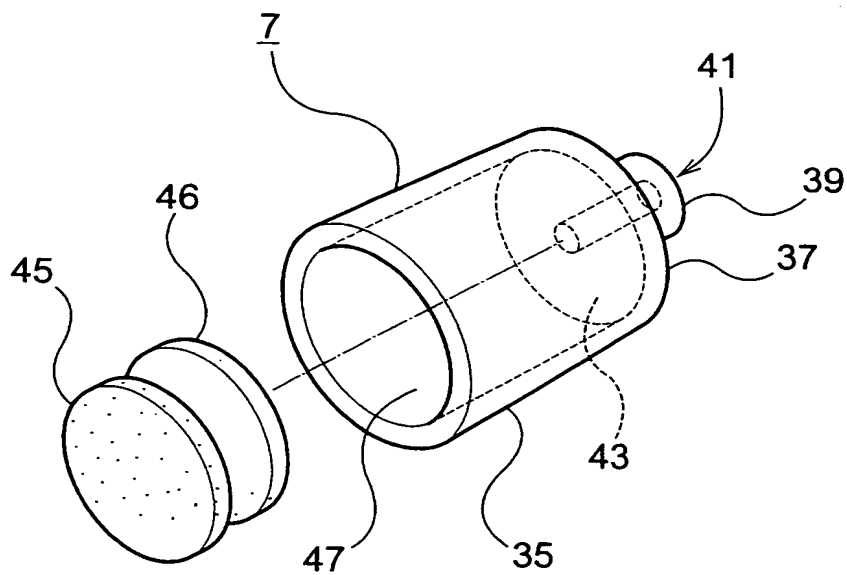
【図 2】



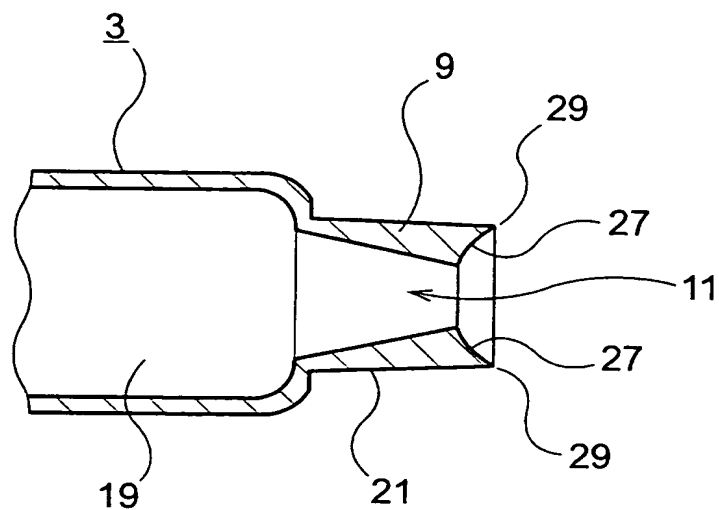
【図 3】



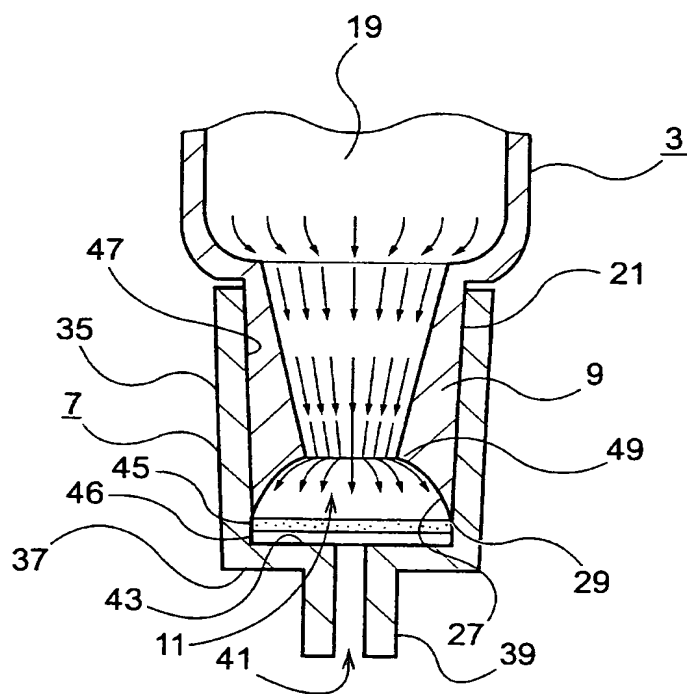
【図 4】



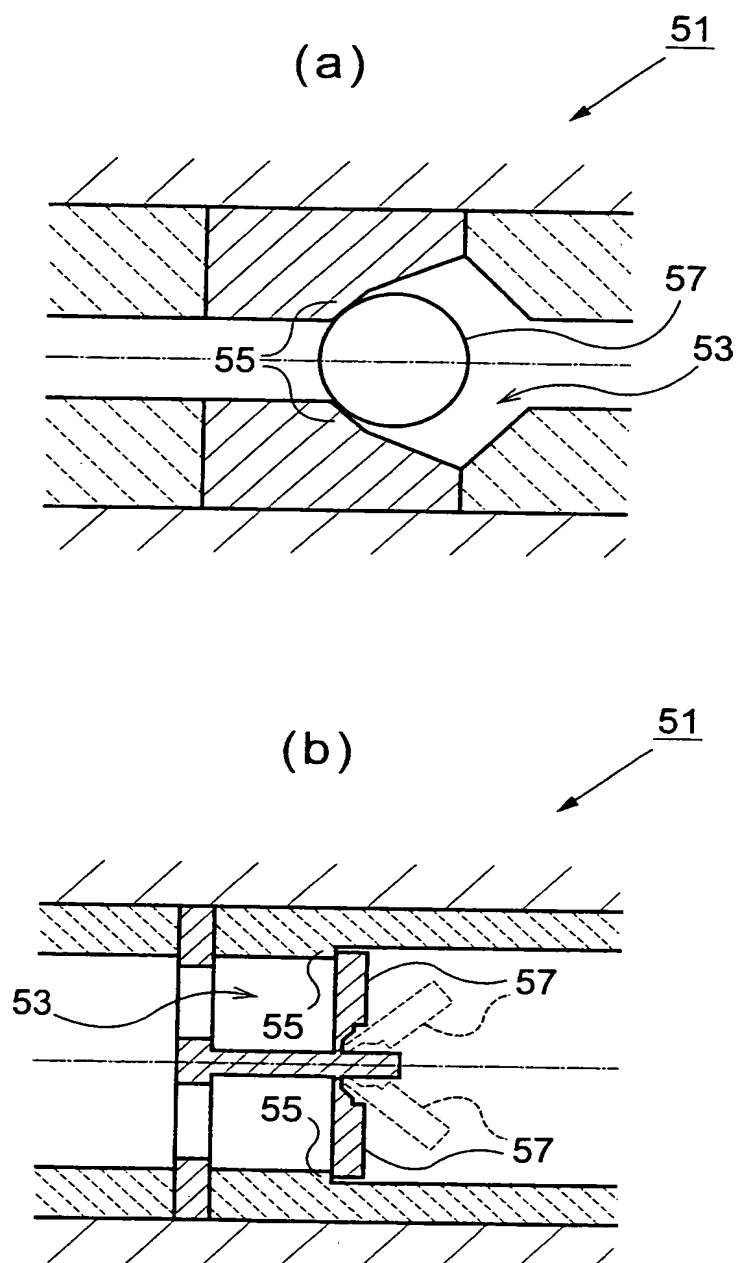
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法を実現し、且つ分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である固相を使用し、かつ操作の時間を短縮した自動化しやすい核酸分離精製装置を提供すること。

【解決手段】 第1開口部が形成される先端部と、第2開口部が形成される基端部とを有し、前記第1開口部と第2開口部との間の収納部内に液体を保持可能な円筒形のシリンジと、

前記先端部に接続され、先端側に流通孔が形成された固相保持部材とを備えており、

前記固相保持部材の内部には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な固相が収納されており、

さらに収納部内の圧力を検出することができる圧力センサーが接続されていることを特徴とする、核酸の分離精製装置。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 9 0 3 8 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社